寡聚核苷酸介导的基因突变技术创制抗除草剂烟草新种质

谢宇峰[1]，秦利军[2]*

（1. 贵州大学 农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室/生命科学学院，贵阳 550025；2. 贵州大学 农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室/生命科学学院，贵阳 550025）

摘要：为进一步优化烟草‘K326’（*Nicotiana tabacum* ‘K326’）种质，该文使用寡聚核酸介导的基因突变（Oligonucleotide-mediated mutagenesis，OMM）技术，利用植物中支链氨基酸合成途径中第一个关键酶乙酰乳酸合成酶（acetolactate synthase，ALS）突变后烟草对除草剂氯磺隆不敏感，产生抗性的特征，利用 NCBI 报道的 *ALS* 基因序列同源克隆了烟草‘K326’中的 *ALS* 基因，并根据 *ALS* 基因序列设计用于定点突变的 RNA/DNA 嵌合体，导入烟草‘K326’创制对氯磺隆除草剂具有抗性的烟草新种质。结果表明：（1）‘K326’具有两条 *ALS* 基因，即 *ALS SuRA* 和 *ALS SuRB*，大小分别为 2 004 bp 和 2 010 bp。（2）根据两个基因的保守位点 *ALS SuRA* 588 脯氨酸位点和 *ALS SuRB* 1 719 色氨酸位点设计了用于 *ALS* 基因核苷酸第 588 位点的 Chl588 和第 1 719 位点的 Chl1719 嵌合体。（3）利用基因枪成功将这两个片段导入烟草愈伤组织，愈伤依次经抗性芽分化和生根，一共获得氯磺隆抗性植株 22 株。（4）抗性植株 ALS 酶活性测定表明，其中 8 株抗性烟株具有较强的活性，进一步对抗性植株中跨突变位点保守扩增、测序，最终确定有两个株（f11 和 b18）分别在 588 位点和 1 719 位点产生定点突变。综上研究结果表明，在获得‘K326’抗氯磺隆新种质的同时，为培育抗性烟草新种质提供了理想的亲本材料。

关键词：烟草，*ALS* 基因，除草剂抗性，氯磺隆，OMM 诱变技术

中图分类号：Q943

收稿日期：2021-01-09

基金项目：贵州大学人才引进基金项目（[2015]24 号）；贵大人才培育项目（贵州科技计划项目[2018]5781 号） [Supported by the Talent Fund Project of Guizhou University ([2015] 24) ; The Talent Training Program of Guizhou University ([2018] 5781)]

作者简介：谢宇峰（1995-），硕士研究生，研究方向为植物基因工程相关研究，(E-mail)577529730@qq.com。

***通讯作者：**秦利军，副教授，硕士生导师，研究方向为烟草分子抗逆境相关研究，(Email)leequine_chin@126.com。

Creating new tobacco germplasm with herbicide-resistance based on Oligon ucleotide-mediated mutagenesis (OMM) technology

XIE Yufeng[1], QIN Lijun[2]*

（1. *Institute of Agro-Bioengineering, Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm In novation in Mountainous Region (Ministry of Education) and College of Life Sciences, Guizhou University,* Guiyang 550025, China; 2. *Institute of Agro-Bioengineering, Key Laboratory of Plant Resources Conserv ation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education) and College of Life Scie nces, Guizhou University,* Guiyang 550025, China）

Abstract: Acetolactate synthase (ALS) is the first key enzyme in the pathway of branched amino acid synthesis in plants, and the mutation of the gene encoding this enzyme can cause the plant to become insensitive to the herbicide chlorsulfuron and develop resistance. Herbicides that target the acetolactate synthase (ALS) are among the most widely used weed contr ol chemicals since their introduction into the marketplace in the early 1980s, including five classe s (sulfonylureas, imdazolinones, triazolopyrimidines, pyrimidinylthio (or oxy)-benzoates and sulfo nylamino-carbonyltriazolinones). The mechanism researches have progressed unprecedentedly in t he last two decades. Primary mode of action of the ALS-inhibiting herbicides that interfere with th e activity of ALS enzyme seems no longer in doubt. Chlorsulfuron was a herbicide, which act o n ALS to inhibit branched chain amino acid synthesis. Then made the plant dath. The herbicide' s sensitivity were closely linked to the differences of ALS. The ALS gene of 'K326' was homo logous cloned from common tobacco 'K326' and RNA/DNA chimeras were designed for s ite-directed mutation based on the ALS gene sequence and imported into the tobacco geno me to create new tobacco germplasm resistant to chlorsulfuron herbicide. In this research (1)Results of gene cloning showed that 'K326' had two *ALS* genes, namely *ALS SuRA* an d *ALS SuRB*, with the sizes of 2 004 bp and 2 010 bp, respectively. (2)The chimera of Chl588 and Chl1719 at site 588 (Pro site) and site 1 719（Try site） of *ALS* gene was d esigned according to the conserved region of two genes. (3)The two fragments were succe ssfully introduced into tobacco callus by gene gun, and the callus were successively differ entiated and rooted by resistant bud, and a total of 22 chlorsulfuron-resistant plants were obtained. (4)The activity of ALS enzyme in resistant plants showed that 8 resistant tobacc o plants had strong activity, and in the further antagonistic plants, conservative amplificatio n and sequencing of cross-mutation loci resulted in site-directed mutations in two lines (li ne f11 and line b18) at loci 588 and 1 719, respectively, which provided ideal parental m aterials for further cultivation of new resistant tobacco germplasm.

Key words: tobacco，*ALS*，herbicide resistance，chlorsulfuron，OMM

普通烟草（*Nicotiana tabacum*）为管状花目（Angiospermae）茄科（Solanaceae）烟草属（*Nicotiana*）一年生或有限多年生草本植物，是一种经济价值较高的作物，除主要用于吸食外，烟草还具有蛋白食用及药用价值。烟草在我国南方、北方均有种植，面积达到 146.67 万 hm^2，年均产量约 30 亿 kg，在我国占有极大的经济市场（张杰等，2018），是国家和地方财税的重要经济来源。烟田杂草危害烟草生产，严重影响烟草的产量和质量。烟田杂草不仅可与烟草争夺水分、养分、光照和空间，又可作为烟草病虫害传播的中间宿主，极大影响了烟草的产量和质量（蔡海林等，2020）。烟田常用除草剂氯磺隆和草甘膦可通过靶向结合植物体中的乙酰乳酸合成酶（acetolactate synthase，ALS）以抑制缬氨酸（valine，Val）、亮氨酸（leucine，Leu）、异亮氨酸（isoleucine，Ile）生物合成，进而导致杂草死亡（Scoloss & Ciskanik, 1988）。这类除草剂在杀灭杂草时具有活性高、药量低，对哺乳动物低毒以及生态环境友好的特点，但会极大影响农作物的生长和发育（牛聪伟，2005；Grandpmo & Peter, 1998）。前人研究表明，ALS 中特定氨基酸突变会使细胞系或植株产生对除草剂的抗性(Kleschick & Costales, 1990; Scoloss, 1990)，如拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中，ALS 氨基酸保守区域第 197 位氨基酸由脯氨酸（proline，Pro）突变为丝氨酸（serine，Ser）时，会导致细胞系具有对氯磺隆（chlorsulfuron，Chl）和苄嘧磺隆（bensulfuron methyl）等磺酰脲类除草剂产生抗性；在甘蓝（*Brassica napus*）中 ALS 保守氨基酸序列（ahas3r）第 557 位 Pro 突变为谷氨酰胺（glutamine，Gln），会导致细胞系具有对三唑嘧啶（triazole pyrimidine）类除草剂抗性(Saari & Maxwell, 1997)；此外，水稻（*Oryza sativa*）中 ALS 特定氨基酸的突变会使植株产生对除草剂的抗性。将 ALS 氨基酸第 95 位甘氨酸（glycine，Gly）突变为丙氨酸（alanine，Ala）后，获得了对双草醚（Bispyribac-sodium）产生抗性的水稻植株(Okuzaki et al., 2007)。在烟草中，通过电穿孔及微粒轰击方式将嵌合体 DNA/RNA 寡居核苷酸导入原生质体中，使其 *ALS* 基因所编码的氨基酸特定位点发生突变（脯氨酸-196-谷氨酸，色氨酸-573-亮氨酸），获得抗氯磺隆的抗性植株(Beetham et al., 1999)。因此，利用分子生物学手段实现代谢关键酶编码基因的定点突变是创制抗除草剂作物新种质的重要手段之一。

寡聚核苷酸介导的基因突变（OMM）技术是一种新的基因诱变技术，已被成功运用于动物及酵母的基因定点突变（Yoon et al., 1996; Alexeev et al., 2000; Bartlett et al., 2000）。在植物中，该技术已成功实现对玉米（*Zea mays*）*AHAS* 基因发生定点突变，引起 AHAS 蛋白中 621 氨基酸由 Ser 突变为天冬氨酸（aspartic acid，Asp），获得了对咪唑啉酮（imidazolone）类除草剂具有抗性的突变玉米植株（Zhu et al., 1999）。同时，Okuzaki(2004)利用 OMM 技术实现了水稻（*Oryza.sativa*）ALS 中第 171 位氨基酸由 Pro 变为 Gly，第 548 位氨基酸由色氨酸（tryptophan，Tyr）变为 Ile 以及第 627 位氨基酸由 Ser 变为 Ile，获得了除草剂抗性水稻。OMM 技术相较应用广泛的成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白 Cas (CRISPR/Cas）技术，以及转录激活样效应因子核酸酶（TALEN）技术(Ishino et al.,1987; Michno et al., 2020)；OMM 技术所诱导的突变几乎是有目的定点突变，不会向生物体内引入新的基因。Breyer et al.（2009）认为，通过 OMM 技术诱导产生的生物不应当归类于转基因生物。在对转基因的生物安全性争论不休的今天，OMM 技术为生物品质的改良提供了一条新的途径。本研究以烟草品‘K326’为材料，利用同源克隆法获得 *ALS* 基因，根据基因保守区结构分析构建 RNA/DNA 嵌合体分子，并利用该嵌合体实现对 *ALS* 基因的定点突变，创制对磺酰脲类除草剂具有抗性的烟草新种质。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

烟草品种‘K326’（*Nicotiana tabacum* ‘K326’）由贵州大学农业生物工程研究院山

地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室保存并提供。DL 2 000 DNA marker、LA Taq with GC Buffer、DNA 快速纯化回收试剂盒购于 Takara 宝生物工程（北京）有限公司；MS 培养基购于 Phyto Technology Laboratoies™ 公司；新型植物 DNA 提取试剂盒均购于 TIANGEN BIOTECH 公司；胶回收试剂盒、pGEM-T Easy Vector System 购自 Promega 公司；氯磺隆购于 Sigma-Aldrich 公司；RNA/DNA 嵌合体由 Takara 公司合成；基因克隆引物由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 烟草‘K326’基因组提取及 *ALS* 基因克隆

以烟草品种‘K326’叶片为材料，使用 TIANGEN BIOTECH 公司新型植物 DNA 提取试剂盒提取烟草基因组 DNA。根据 NCBI 中报道的普通烟草（Nicotiana tabacum）ALS 基因（基因登录号：X07644.1 和 X07645.1）序列设计同源克隆引物及含 588 位点和 1 719 位点突变区扩增引物，引物序列详见表 1。

表 1 烟草 *ALS* 基因的克隆及保守区扩增引物

Table 1 Primer sequences of tobacco *ALS* gene

引物 Primer	引物序列 Primer sequence
SuRA F	5′-ATGGCGGCGGCGGCTCCATCTCCCTCTTC-3′
SuRA R	5′-TCAATAGGAACTTCTCCCGTC-3′
SuRB F	5′-ATGGCGGCGGCTGCGGCGGCTCCATCTCCC-3′
SuRB R	5′-TCAATAGGAACTTCTCCCGTC-3′
588 F	5′-GGGCGGTGTCTTCGCCGCTG-3′
588 R	5′-GGGGATACCCGTGAGCTCCACG-3′
1719 F	5′-CCAACTGGGGATGAGCTTTCCC-3′
1719 R	5′-GGGCAAACCAAATCCCATTGCTCC-3′

参照 Takara 公司 LA Taq with GC buffer 试剂盒操作对 *ALS* 基因进行扩增。扩增体系（50 μL）：0.5 μL TaKaRa *LA* Taq（5 U·μL^{-1}），25.0 μL 2 × GC BufferⅡ，8.0 μL dNTP Mixture（2.5 mmol·L^{-1}），1.0 μL R-F（20 μmol·L^{-1}），1.0 μL R-R（20 μmol·L^{-1}），1.0 μL 基因组 DNA（100 ng）和 13.5 μL ddH$_2$O。扩增条件 94 ℃预变性 3 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 160 s，35 个循环后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.2 PCR 产物连接及测序

参照 Promega 公司胶回收试剂盒操作回收 PCR 产物，参照 Promega 公司 pGEM-T Easy Vector System 试剂盒说明将回收的 PCR 产物连接于 pGEM-T Easy Vector。连接有 PCR 产物的 pGEM-T Easy Vector 导入大肠杆菌（*Escherichia coli*）DH5α感受态菌株。将工程菌送至北京诺赛公司进行测序。利用 DNAMAN9.0 软件中“序列拼接功能”对测序结果进行

拼接，将拼接结果于 NCBI 数据库中进行比对，确认保守区。

1.2.3 RNA/DNA 寡聚核苷酸嵌合体构建

基于‘K326’烟草 *ALS* 基因保守区的结构，参照 Kochevenko & Willmitzer（2003）的方法设计 RNA/DNA 嵌合体序列，交由 Takara 公司合成。嵌合链设计基本要求是与靶基因的序列一样（除了突变位点外），通过寡聚核苷酸链代换，引入靶位点碱基序列变化。

1.2.4 基因枪介导的 RNA/DNA 导入烟草愈伤组织

1.2.4.1 烟草‘K326’愈伤诱导及氯磺隆敏感性分析

参照谭颖等（2013）的方法略有改动，对烟草‘K326’的愈伤组织进行诱导。烟草叶片经 75%的酒精灭菌 30 s，0.1%$HgCl_2$ 消毒 8 min，无菌水清洗 3~5 次后切块（0.5 cm×0.5 cm）接种于愈伤诱导培养皿上，经过两周诱导培养后，转接于新鲜继代培养基上继续培养至出现分化芽点，分化芽接种生根培养基上生根培养。愈伤诱导培养基：MS + 1.5 mg·L^{-1} 6-BA + 0.1 mg·L^{-1} NAA；继代培养基：MS + 1.0 mg·L^{-1} 6-BA + 0.2 mg·L^{-1} NAA。将烟草愈伤组织继代培养基分组，分别加入不同浓度的氯磺隆，对愈伤组织进行氯磺隆敏感性实验。氯磺隆浓度梯度分别设置为 90、100、110、120、130、140、150、160 nmol·L^{-1}。每个皿接种相同数量、生长状态近似的愈伤组织进行继代培养，培养条件为光照强度为 2 000 lx，每日光照 16 h，培养温度（26 ± 1）℃。培养 1 周后观察愈伤组织生长情况。抗性芽生根培养基：1/2MS + 0.1 mg·L^{-1} NAA。愈伤诱导培养基和继代培养基中补加 30 g·L^{-1} 蔗糖和 8 g·L^{-1} 琼脂，生根培养基中补加 30 g·L^{-1} 蔗糖和 6 g·L^{-1} 琼脂，各培养基 pH 均为 5.8。

1.2.4.2 RNA/DNA 寡聚核苷酸嵌合体微弹制备

基因枪微弹的制备参照 Bio-Rad PDS-1000He 使用说明书，根据程义琳等（2013）实验方法，略有改动，设计基因枪轰击实验流程：（1）称量 8 mg 金粉置于 1.5 mL EP 管中；（2）加入 1 mL 无水乙醇，漩涡震荡 3~5 min，10 000 r·min^{-1} 离心 1 min，弃上清（重复 3 次）；（3）加入 1 mL 无菌水，震荡 1 min；（4）加入 133 μL 无菌水，储存在-20 ℃待用；（5）加入 13.3 μL 嵌合体震荡 2~3 s；（6）加入 133 μL 2.5 mol·L^{-1} $CaCl_2$ 震荡 2~3 s；（7）加入 53.3 μL 0.1 mol·L^{-1} spermidine，震荡 2~3 s；（8）在冰上静置 10 min，10 000 r·min^{-1} 离心 10~20 s，弃上清；（9）加入 500 μL 无水乙醇，冲洗 2 次，离心 10 s，弃上清；（10）加入 160 μL 无水乙醇，均匀后，4 ℃备用（每次使用 10 μL）。

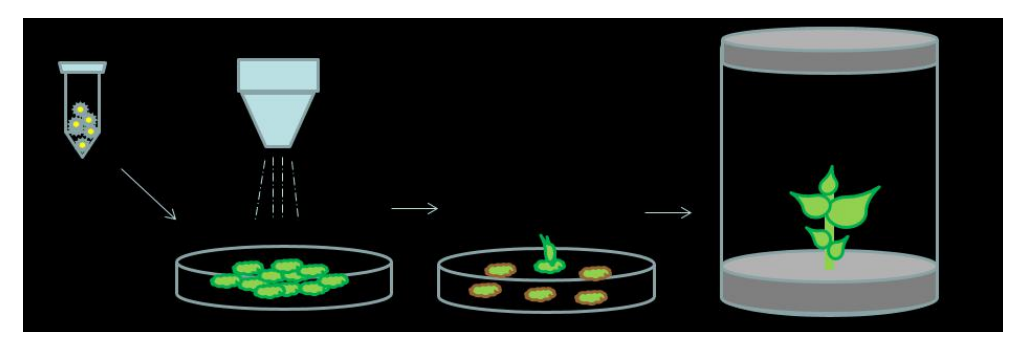


图 1 基因枪轰击实验模拟流程图

Fig. 1 Flowchart of heritage transformed tobacco by bombardment

1.2.4.3 基因枪介导的 RNA/DNA 导入烟草愈伤

参照 Kochevenko & Willmitzer（2003）和程义琳等（2013）的实验方法，略有改动。具体操作：（1）打开超净台，用 70%乙醇擦拭超净台内部与基因枪的表面及基因枪内部；（2）打开紫外灯，灭菌 30 min，灭菌后吹风 20 min；（3）易裂片、微弹载体及阻拦网置于 70%乙醇 10 min，放在无菌滤纸上自然晾干；（4）打开氦气瓶，将压力调制 1 100 psi；（5）将易裂片、微弹载体及阻拦网安装并固定在基因枪真空室，将带有烟草愈伤组织的培养皿放在托盘上，调节轰击距离为 9 cm，关闭基因枪门，打开电源及真空泵；（6）按下真空键“VAC”，当真空表读数为 25 inHg 时，按维持键“Hold”；（7）然后按下“Fire”键，轰击结束，按下“通气键”至真空表读数为零。打开基因枪门，取出培养皿，盖好盖子用封口膜封好，转入组培室，暗恢复 2 d 后，氯磺隆筛选培养，温度为（26 ± 1）℃，光照强度为 2 000

lx，光照时间为 16 h。共做 12 批次，每批次接种 25 皿，每皿接种 30~40 个愈伤组织（d= 0.5 cm)，共计约 9 500~10 000 个愈伤组织块。

1.2.5 抗性分化植株 ALS 酶活的检测

参照陈以峰等（1998）的提取方法，取移栽后 3 周的野生型烟草‘K326’叶片 1 g，首先加入提取介质（磷酸缓冲液 A）1 mL，匀浆，并于 2 500 $r\cdot min^{-1}$ 离心，20 min，取上清即为粗酶液。而后取 0.5 mL 反应介质（磷酸缓冲液 B），加入不同浓度的氯磺隆，这里设氯磺隆浓度梯度 0~500 $nmol\cdot L^{-1}$。然后加入 30 μL 粗酶液，总体积 0.9 mL，蒸馏水补齐。3 7 ℃温育 1 h，加入 50 μL 3 $mol\cdot L^{-1}$ 的 H_2SO_4 中止反应。最后依次加入 0.5 mL 0.83%甲萘酚和 0.5 mL 肌酸，60 ℃温育 15 min，将溶液于 2 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min，取上清于分光光度计 530 nm 比色。ALS 活性直接用 A530 nm 值来表示。以野生型烟草品种‘K326’为对照，测定抗性植株的 ALS 酶活。

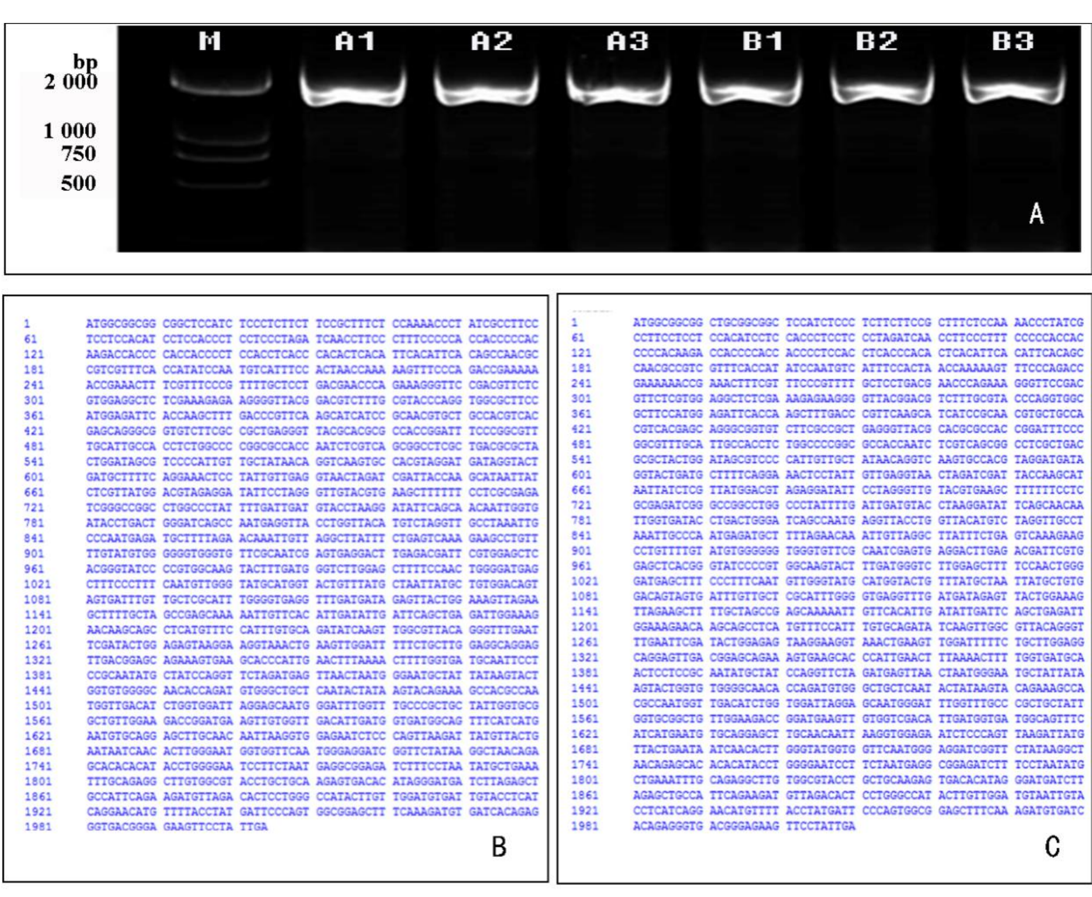
1.2.6 抗性分化植株突变位点验证

根据‘K326’烟草 *ALS* 基因突变位点，选择跨该区段的引物进行扩增，扩增后进行测序，分析拟突变位点的变化情况，PCR 产物扩增、连接及测序参照 1.2.2 节。

2 结果与分析

2.1 ‘K326’烟草 *ALS* 基因克隆

以烟草‘K326’基因为模板，利用引物对 SuRA F/SuRA R 和 SuRB F/SuRB R 进行 PCR 扩增，均扩增得到一条长度约为 2 000 bp 的条带，且扩增条带清晰明亮。将该 PCR 产物分别胶回收后以 pGEM-T Easy Vector 进行连接，连接后的质粒载体导入 *Escherichia coli* DH5α感受态菌株筛选阳性菌落，阳性菌落送至北京诺赛公司进行测序。测序拼接结果表明，以 SuRA F/SuRA R 引物扩增到序列长度为 2 004 bp 的基因，命名为‘K326’ *ALS SuRA*，而以 SuRB F/SuRB R 扩增到序列长度为 2 010 bp 的基因，命名为‘K326’ *ALS SuRB*（图 2）。



A.‘K326’*ALS* 基因 PCR 扩增，**M** 代表 DNA 2 000 bp Marker；**A1-A3** 分别代表 SuRA F/SuRA R 扩增产物；**B1-B3** 分别代表 SuRB F/SuRB R 扩增产物。**B-C**.‘K326’*ALS SuRA* 和‘K326’*ALS SuRB* 测序结果。

A. PCR amplification of ‘K326’ *ALS* gene, **M** represent 2 000 bp Marker; **A1-A3** represent SuRA F/SuRA R amplification; **B1-B3** represent SuRB F/SuRB R amplification. **B-C**.The product sequencing of ‘K326’ *ALS SuRA* and ‘K326’ *ALS SuRB*.

图 2 烟草‘K326’ *ALS* 基因扩增及 PCR 产物测序

Fig. 2 PCR amplification of *Nicotiana tabacum* var. ‘K326’ *ALS* gene and product sequen

cing

2.2 RNA/DNA 寡聚核苷酸嵌合体设计

参照 Kochevenko & Willmitzer（2003）的方法，结合‘K326’*ALS SuRA* 和‘K326’*ALS SuRB* 基因保守序列的比对，设计以‘K326’*ALS* 基因编码区第 588 位核苷酸由胞嘧啶（cytosine，C）突变为腺嘌呤（adenine，A）的颠换，第 1 719 位核苷酸由鸟嘌呤（guanine，G）突变为胸腺嘧啶（thymine，T）的颠换。针对 *ALS* 编码区核苷酸第 588 位点、1 719 位点设计突变碱基的嵌合体分别命名为 Chl-588 和 Chl-1719（图 3）。

ChALS- 588

5′CAggTCAAgTgCAACgTAggATgATTTTTAUCAUCCUACTTgCACUUgACCUggCgCgTTTTCgCgC3′

ChALS-1 719

5′TggTggTTCAATTggAggATCggTTTTTTAACCgAUCCUCCAATUgAACCACCAgCgCgTTTTCgCgC3′

大写字母为 DNA 残基，小写字母为 2′-O-RNA 残基，框内字母代表突变位点。

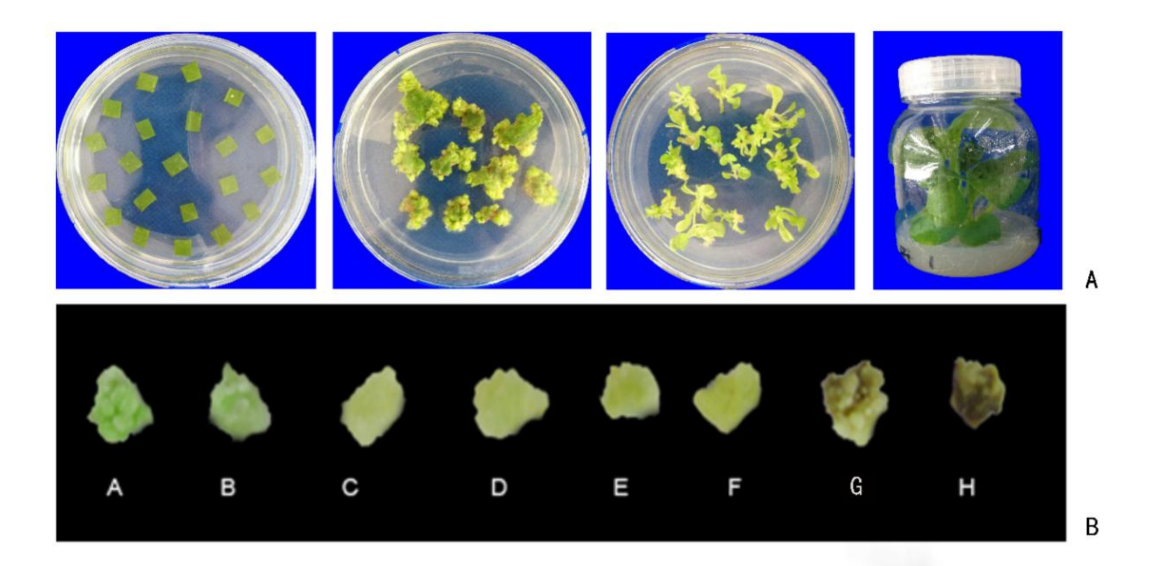
The capital letters represent DNA residues. Lowercase letters represent 2′-O-RNA residues. The letters in box represent the mutation site.

图 3 嵌合体 RNA/DNA 寡聚核苷酸

Fig. 3 Construction of chimeric RNA/DNA oligonucleotide

2.3 ‘K326’愈伤组织诱导及敏感性分析

通过优化的愈伤诱导培养基获得了嫩绿色至淡黄色、结构致密的愈伤组织，可用于后续氯磺隆敏感试验和抗性芽诱导实验。烟草‘K326’愈伤组织形成后，接种于含有不同浓度氯磺隆的筛选培养基中生长 1 周，愈伤组织的颜色从低浓度到高浓度分组颜色有绿色变黄直至黑色（图 4）。在氯磺隆浓度为 90 $nmol·L^{-1}$ 和 100 $nmol·L^{-1}$ 时，愈伤组织为绿色，生长状态良好；在氯磺隆浓度为 110、120、130 和 140 $nmol·L^{-1}$ 时，愈伤组织颜色为黄色且颜色依次变暗；当氯磺隆浓度达到 150 $nmol·L^{-1}$ 时，愈伤组织颜色呈棕色，且不继续生长；在氯磺隆浓度达到 160 $nmol·L^{-1}$ 时，愈伤组织呈黄黑色，逐渐发生褐化现象最后死亡，因此本研究选择氯磺隆浓度 150 $nmol·L^{-1}$ 作为筛选的临界浓度。



A. 烟草愈伤诱导及分化；**B.** 愈伤组织对不同浓度氯磺隆敏感性响应；**A-H** 分别为 90、100、110、120、130、140、150 和 160 nmol·L^{-1} 氯磺隆。

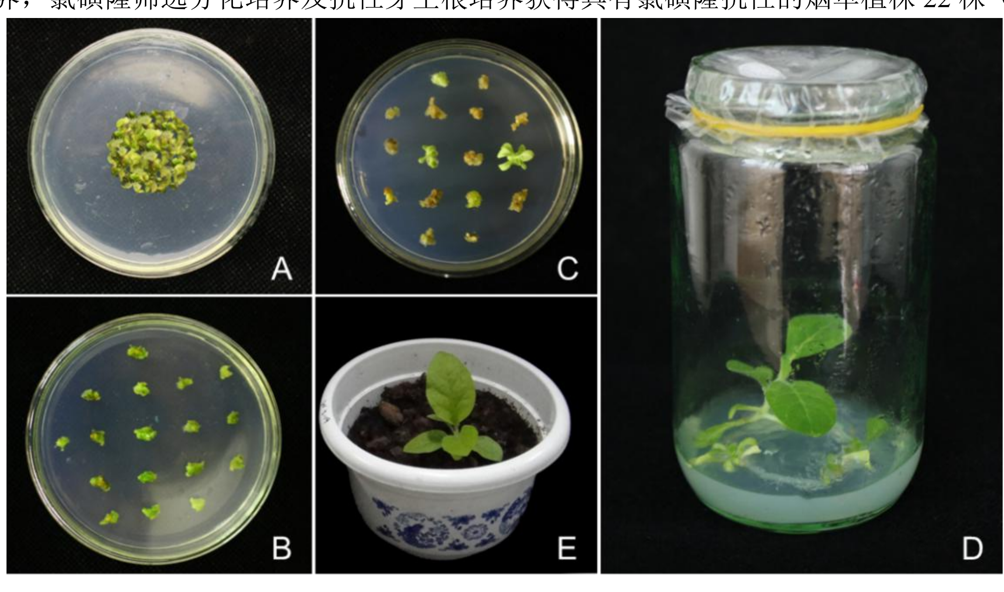
A.Callus induction and differentiation in tobacco； **B.** Callus were sensitive to different concentrations of chlorsulfonon; **A-H** represent the concentration of chlorsulfonon 90、100、110、120、130、140、150 and 160 nmol·L^{-1}

图 4 烟草‘K326’愈伤组织诱导及氯磺隆敏感性分析

Fig. 4 Callus induction of tobacco ‘K326’ and sensitivity analysis of chlorsulfuron

2.4 基因枪轰击处理及抗性烟苗获得

参照程义琳等（2013）的方法，结合耿立召等（2005）和宫本贺等（2010）的方法，用包裹金颗粒的 RNA/DNA 寡聚核苷酸嵌合体 Chl-588 和 Chl-1719 以 9 cm 的轰击距离、25 inHg 的轰击压强对烟草‘K326’愈伤组织进行基因枪轰击处理。轰击后的愈伤组织经过恢复培养，氯磺隆筛选分化培养及抗性芽生根培养获得具有氯磺隆抗性的烟草植株 22 株（图 5）。



A. 基因枪轰击后的愈伤；**B.** 愈伤组织在筛选培养基上培养；**C.** 筛选出抗性芽；**D.** 抗性芽生根培养；**E.** 获得抗性苗。

A. Callus after gene gun bombardment；B. Callus were cultured on screening medium；C. Screening resistant plants；D. Root induction；E. Obtain resistant plants.

图 5 烟草品种‘K326’基因枪遗传转化体系

Fig. 5 Process of gene gun gemetic transformed tobacco

2.5 抗性烟苗的 ALS 酶活性测定

通过对野生型烟草品种‘K326’的 ALS 酶活性进行不同浓度氯磺隆敏感性检测，发现在氯磺隆浓度为 300~500 μmol·L^{-1} 阶段 ALS 酶活性保持最低，在小于 300 μmol·L^{-1} 时，随着氯磺隆浓度逐渐降低，ALS 酶活性逐渐增强，于是选取 310 μmol·L^{-1} 的氯磺隆作为检测 ALS 酶活性的标准。抗性植株与野生型 ALS 酶活性检测结果显示，在抗性植株中有 8 株（Chl-3、Chl-5、Chl-8、Chl-11、Chl-12、Chl-18、Chl-20、Chl-22）的 ALS 酶活性明显高于野生型（图 6），故推测这 8 株为定点诱变成功的可能性较大。

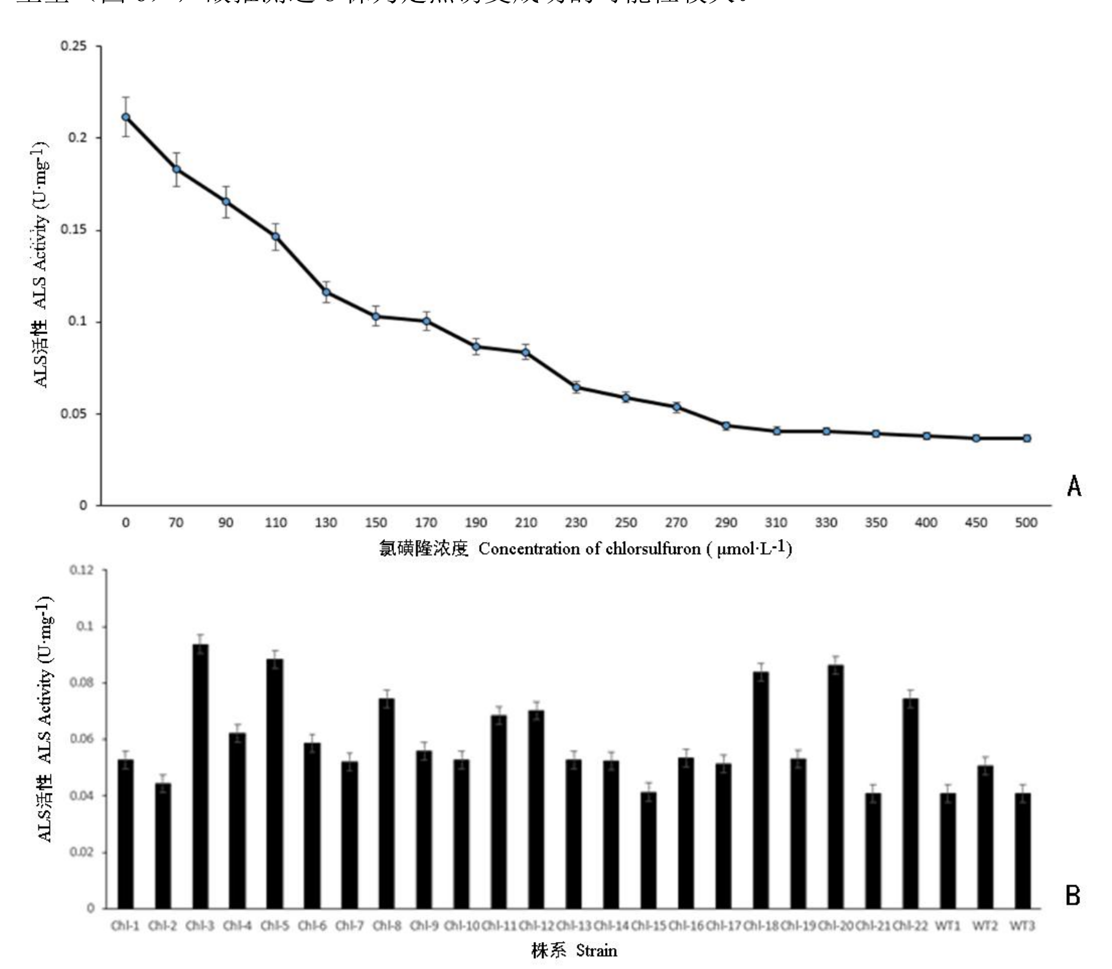


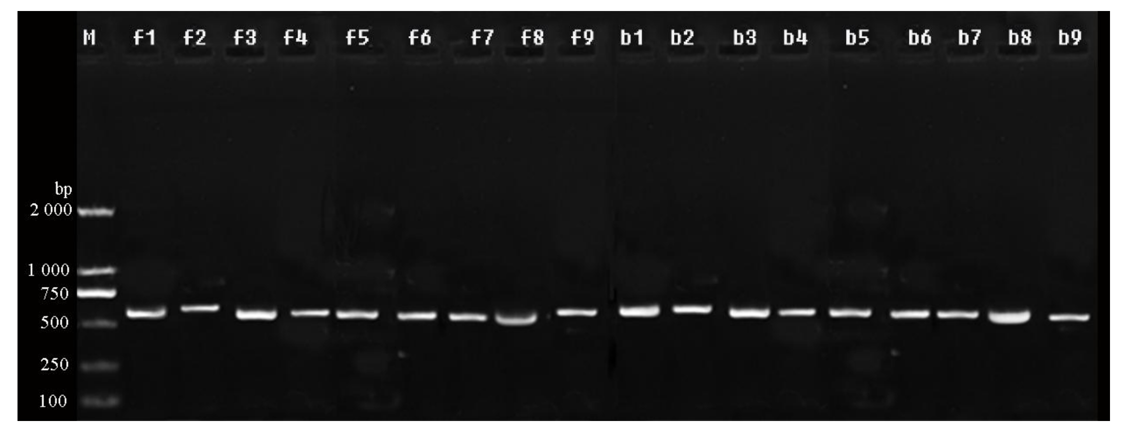
图 6 氯磺隆对 ALS 酶活影响及抗性烟株 ALS 酶活性变化

Fig. 6 Effects of chlorsulfuron on ALS enzyme activity and ALS enzyme activity detection in different resistance plants

2.6 抗性烟苗 *ALS* 基因突变区序列扩增及测序

利用特异引物，对‘K326’*ALS* 中 588 位点的保守区及 1 719 bp 位点的保守区进行 PCR 扩增，产物直接进行测序，扩增产物无杂带（图 7），在上述 22 个抗性植株中检测到 2

株发生了特定位点的突变，命名为突变株系 f11 和 b18，前者在 588 位点发生了 C→A 的突变，后者在 1 719 位点发生了 G→T 的突变（图 8）。

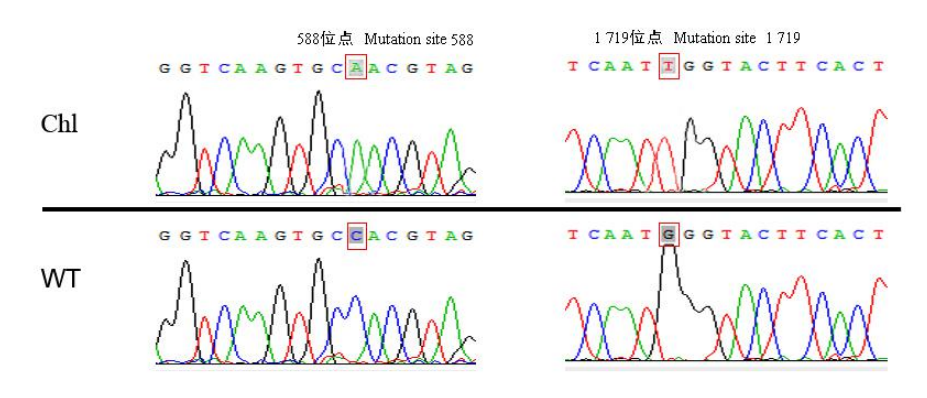


M. DNA 2 000 bp Marker；**f1-f9**. 扩增含 588 位点区域；**b1-b9**. 扩增含 1719 位点区域。

M. DNA 2 000 bp Marker；**f1-f9**. The region containing 588 loci was amplified；**b1-b9**. The region containing 588 loci was amplified.

图 7 含突变位点区段 PCR 扩增

Fig. 7 PCR amplification with segment contained mutant sites



Chl. 抗性植株的测序结果，**WT**. 野生型的测序结果。

Chl. Represent sequencing resistant plants. **WT**. Represent wild type plants were sequenced.

图 8 含突变位点区段测序

Fig. 8 Segment sequencing with mutation site

3 讨论与结论

利用生物学手段实现植物体中关键代谢基因的定点突变，能降低植物对除草剂的不敏感性，从而提高突变植株对除草剂的抗性，但效率较高的基因定点编辑生物学手段 CRISPR/Cas 及 TALEN 技术，在操作的过程中引入了外源基因 (Ishino et al., 1987; Michno et al., 2020)；因此在转基因作物严格管制的今天难以广泛推广种植。OMM 技术理论上不涉及转基因，该技术所得新种质，在种植领域上有其得天独厚的优势。

烟草品种‘K326’*ALS* 基因测序结果中发现，该品种 *ALS* 基因序列全部为编码区，无内含子序列，从起始密码子至终止子序列完整，而 NCBI 报道的普通烟草品种与‘K326’

品种的 *ALS* 基因存在一定差别（Keeler et al., 1993），NCBI 中烟草 *ALS SuRA* 基因序列长度为 2 004 bp，与‘K326’*ALS SuRA* 基因序列长度一致；而 *ALS SuRB* 基因序列长度为 1 995 bp，‘K326’*ALS SuRB* 长度为 2 010 bp，推测是由于品种之间的差异性所导致。‘K326’*ALS SuRA* 基因与 NCBI 报道的烟草品种 *ALS SuRA* 尽管序列长度一致，但存在一个碱基的区别，即烟草品种‘K326’*ALS* 基因编码区序列的第 831 位发生了 A 到 G 的简并突变，氨基酸密码子由 UUA 变成 UUG，然而都编码氨基酸 Leu，为简并突变，经过多次 PCR 和重复测序证实结果正确无误，证实这一突变为烟草品种‘K326’本身的差异性。根据‘K326’*ALS SuRA* 和‘K326’*ALS SuRB* 的保守区，结合 Beethan et al.（1999）以及 Kochevenko & Willmitzer（2003）的报道，设计了用于‘K326’*ALS* 定点突变的 RNA/DNA。

由于 Kochevenko & Willmitzer(2003)研究的烟草品种 *ALS* 基因并非‘K326’，所以在报道位点上存在位置偏离，为了解决这个问题实验中找到与完全配对的目标序列，设计突变位点，命名为 Chl-588 和 Chl-1719。在寡聚核苷酸嵌合体设计过程中，为了避免嵌合体不稳定，对片段进行甲基化保护。在 Yoon et al.（1996）、Alexeev et al.（2000）和 Bartlett et al.（2000）的研究发现，RNA/DNA 寡聚核苷酸链自身互补形成的双链发夹结构，在这种双链结构中，两条互补双链的区别非常明显，其中一条嵌合体链是由 5 bp 的 DNA 片段及分别位于该 DNA 片段两边的 10 bp 的 RNA 区域组成，而另一条链全是由 DNA 构成，利用载体的特殊结构（两组胸腺嘧啶脱氧核苷连接互补的两条链，在 3′ 末端的“GC”帽子结构及 2′ -O-甲基 RNA 残基），使其在细胞中具有较好的稳定性。所以，实验设计时也采用同样的方法保证了在转化过程中的稳定性。

本实验利用基因枪轰击法将将定点诱变的 RNA/DNA 寡聚核苷酸嵌合体 Chl-588 和 Chl-1719 轰击烟草品种‘K326’愈伤组织，定点突变烟草 *ALS* 基因，以期得到具有氯磺隆抗性的烟草品种‘K326’植株。耿立召等（2005）提出轰击距离是基因枪转化成功的关键因素，认为基因枪轰击烟草的轰击距离为 9 cm。本研究中探索了基因枪轰击烟草品种‘K326’愈伤组织的轰击距离和轰击压强。结果得出的轰击烟草品种‘K326’愈伤组织的最佳距离与苏宁等（2002）的研究结果一致，这说明在烟草基因枪轰击实验中，轰击条件在不同品种之间差别不大。在氯磺隆筛选过程中，假阳性明显，分化培养基中筛选出的芽在生根培养时大量死亡，本研究认为可能与愈伤组织在含有氯磺隆的培养基中多次继代培养造成的，多次继代培养后使愈伤组织表现了对氯磺隆抗性的假阳性，这一结论与李学宝和毛慧珠（1999）认为的多次继代培养使得对抗生素产生抗性基本一致。抗性植株 ALS 酶活性检测结果表明部分抗性植株的 ALS 酶活性高于野生型，可以初步说明抗性植株目标位点发生了碱基突变与氨基酸发生了突变，但具体还要看测序的结果。

通过对抗性植株 *ALS* 基因测序，目标位点测序结果表明，在目标位点仅有 2 株抗性植株发生了定点突变，即发生 588 位点 C 到 A 的突变和 1 719 位点由 G 到 T 的突变。但多数抗性植株并未出现定点突变，推测实验结果可能存在的可能：（1），烟草染色体为异源四倍体，*ALS* 基因存在两个拷贝（Kochevenko & Willmitzer., 2003），且两个拷贝之间存在一定程度的差异，在基因扩增及 RNA/DNA 嵌合体定点诱变上带来一定难度；或因是四倍体，在克隆测序时送出的克隆不是突变的那一个拷贝（2），推测 RNA/DNA 嵌合体诱变了其他位点使烟草产生除草剂抗性。烟草 AHAS 序列的 W464 位点突变后可以产生抗性。引起植株具有氯磺隆抗性的原因需要进一步去验证。（3），所得诱变植株假阳性概率较高，成功突变的植株较少，Beethan et al. (1999)以及 Kochevenko & Willmitzer (2003)的研究也报道了相似的结果。目前 OMM 法的定点诱变在烟草愈伤的诱变条件还处于初步探索阶段。当 OMM 技术与工程核酸酶 TALENs 或 CRISPR/Cas9 一起使用时，观察到的精确无痕基因组编辑的频率显著增加(Sauer et al,. 2016)。但在编辑的过程中引入外源基因，这会使 OMM 独特的不涉及转基因过程的技术优势荡然无存，所得作物无法大田推广。后期对 OMM 技术的优化，以及 T1 和 T2 代的检测筛选试验还在不断的探索完善过程中。

参考文献

ALEXEEV V, IGOUCHEVA O, DOMASHENKO A, et al.，2000. Localized *in vivo* genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA-DNA oligonucleotide[J]. Nat Biotechnol, 18: 43-47

BARTLETT RJ, STOCKINGER S, DENIS MM, et al.，2000. *In vivo* targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide [J]. Nat Biotechnol, 18: 615-622

BEDELL VM, WANG Y, CAMPBELL JM, et al.，2012. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system[J]. Nat Med, 491(7422): 114-118.

BREYER D, HERMAN P, BRANDENBURGER A, et al.，2009. Commentary: Genetic modification through oligonucleotide-mediated mutagenesis. A GMO regulatory challenge? [J]. J Eeviron Biol, 8(2): 57-64.

BEETHAM PR, KIPP PB, SAWYCKY XL, et al.，1999. A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 96(15): 8774-8778.

CAI HL, XIE PF, ZHAI ZG, et al.，2020. Research progress in weed chemical control and herbicide caused phytotoxicity in tobacco fields[J]. Chin plant protect, 40(11):23-27. [蔡海林, 谢鹏飞, 翟争光, 等，2020. 烟田杂草化学防除及除草剂药害研究现状[J].中国植保导刊, 40(11):23-27.]

CHENG YL, LU LT, ZHAO DG ，2013. *Bispyribac-sodium* sensitivity of local rice varieties in Guizhou and cloning and analysis of *ALS* gene[J]. Guizhou Agric Sci, 41(8): 1-5. [程义琳, 吕立堂, 赵德刚，2013. 贵州地方水稻品种对双草醚的敏感性及其 *ALS* 基因的克隆与分析[J]. 贵州农业科学, 41(8): 1-5].

CHEN YF, ZHOU Y, TANG RS et al.，1998. Correlation between appearance of embryogenic cells and the IAA levels in rice somatic cell culture[J]. J Integr Plant Bio, 40: 474-477. [陈以峰, 周燮, 汤日圣, 等，1998. 水稻体细胞培养中胚性细胞出现与IAA的关系[J]. 植物学报, 40: 474-477.]

DI LZ, LI FF, LIU CL, et al.，2004. Elementary exploration on factors of influencing transformation via[J]. Cotton Sci, 16: 352-356. [耿立召, 李付广, 刘传亮, 等，2004. 影响基因枪轰击转化棉花胚性愈伤的因素初探[J]. 棉花学报, 16: 352-356.]

GRANDPMO JA, PETER JM，1998. Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential antitaberculosis agents[J]. J Antimicro Chemother, 42: 475-482.

ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al.，1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. J Bacteriol, 169 (12): 5429-5433.

KLESCHICK WA, COSTALES MJ，1990. New herbicidal derivatives of 1,2,4-Triazolo1,5-a pyrimidine[J]. Pestic Sci, 29: 341-355.

KOCHEVENKO A, WILLMITZER L，2003. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modifycation of the tobacco acetolactate syntase gene[J]. Plant Physiol, 132: 174-184.

KEELER S, SANDERS P, SMITH J, et al.，1993. Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression[J]. Plant Physiol, 102(3):1009-1018.

LI XB, MAO HZ，1999. *Brassica napus* insect-resistant transgenic plants and their resistance analysis[J]. J Genet Genom, 26: 262-268. [李学宝, 毛慧珠，1999. 甘蓝型油菜抗虫转基因植株及其抗性分析[J]. 遗传学报, 26: 262-268.]

MICHNO JM, VIRDI K, STEC AO, et al.，2020. Integration, abundance, and transmission

of mutations and transgenes in a series of CRISPR/Cas9 soybean lines[J]. BMC Biotech, 20(1):1-13.

NIU CW，2005. Study on the chemical biology of *Acetylhydroxy* acid synthase with impor tant agronomic significance[D]. Tianjin: Nankai University. [牛聪伟，2005. 具有重要农学意义的乙酰羟基酸合成酶的化学生物学研究[D].天津：南开大学.]

OKUZAKI A, SHIMIZU T, KAKU K，2007. A novel mutated acetolactate synthase gene conferring specific resistance to pyrimidinyl carboxy herbicides in rice[J]. Mol Biol, 64: 219-224.

SCOLOSS JV, CISKANIK L，1988. Origin of the herbicide binding site of acetolactate sy nthase[J]. Nature, 331: 360-362.

SCOLOSS JV，1990. Acetolactate synthase, mechanism of action and its heribicide binding site[J]. Presticide Sci, 29: 283-292.

SAARI LL, CA MAXWELL，1997. Target-site resistance for acetolactate synthase inhibitor herbicides[M]. Weed Crop Resist Herbic: 81-88.

SU N, FENG L, YANG B, et al.，2002. Expression of *Oryzacystatin* in transgenic tobacco chloroplast[J]. Acta Agron Sin, 28: 301-304. [苏宁，冯丽，杨波，等，2002. 水稻巯基蛋白酶抑制剂基因在烟草叶绿体中的表达[J]. 作物学报，2002，28：301-304.]

SAUER NJ, NARV EZ V J, MOZORUK J, et al.，2016. Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants [J]. Plant physiol, 170(4):1917-1928.

TAN Y, QIN LJ, ZHAO D, et al.，2013. The overexpression of *HAK1* gene improved the absorbing ability for potassium in transgenic tobacco by co-transformation method[J]. Pla nt Physiol J, 2013, 49(7): 689-699. [谭颖，秦利军，赵丹，等，2013. 共转化法获得*HAK1*基因高表达烟草提高植株钾吸收能力[J]. 植物生理学报，49(7)：689-699.]

YOON K, COLE-STRAUSS A, KMIEC EB，1996. Targeted gene correction of episomal DNA in mam malian cells mediated by a chimeric RNA center dot DNA oligonucleotid e[J]. Proc Acad Sci USA, 93: 2071-2076.

ZHANG J, HUANG HT, YANG LJ, et al.，2018. Nitrogen forms affecting tobacco growth and quality: research progress[J]. Chin Agric Sci Bull, 34(15): 38-43. [张杰，黄海棠，杨立均，许自成，2018. 氮素形态对烟草生长及品质影响的研究进展[J]. 中国农学通报，34(15)：38-43.]

ZHU T, PETERSON DJ, TAGLIANI L，1999. Targeted manipulation of maize genes *in vivo* using chimeric RNA/DNA oligonucleotides[J]. Acad Sci, 15(96): 8768-8773